

MICROFABRICATED DETECTION STRUCTURES

Patent number: JP7506257T
Publication date: 1995-07-13
Inventor:
Applicant: UNIV PENNSYLVANIA (US)
Classification:
- **international:** C12M3/08; C12M1/34; G01N33/50
- **european:** B01D61/18; B01D67/00H10D; B01D71/02; B01J19/00C;
B01J19/00R; B01L3/00C6M; B01L7/00D; B01L7/00D2;
C12M1/26; C12M1/34; C12M3/00; C12M3/08;
C12Q1/68D4
Application number: JP19930519504T 19930429
Priority number(s): WO1993US04018 19930429; US19920877536
19920501; US19920877661 19920501; US19920877662
19920501; US19920877701 19920501; US19920877702
19920501

Also published as:

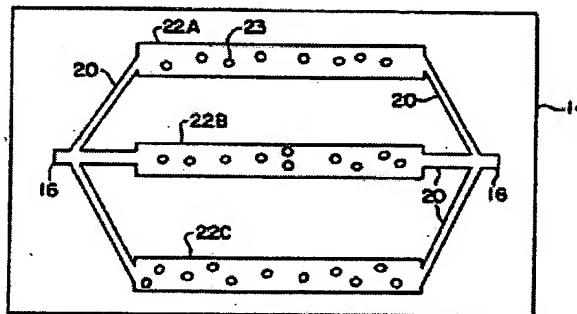
- WO9322421 (A1)
- WO9322058 (A1)
- WO9322058 (A1)
- WO9322058 (A1)
- WO9322055 (A3)

[more >>](#)[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP7506257T

Abstract of corresponding document: **WO9322053**

Disclosed are devices for detecting the presence of a preselected analyte in a fluid sample. The devices comprise a substrate microfabricated to define a sample inlet port (16), and a mesoscale flow system that includes a sample flow channel (20) extending from the inlet port. The mesoscale flow system further includes an analyte detection region (22) in fluid communication with the flow channel (20) comprised of a binding moiety for specifically binding the analyte. The detection region is constructed with a mesoscale dimension sufficiently small to enhance binding of the binding moiety and the analyte. The binding moiety may be immobilized in the detection region. The mesoscale detection systems of the invention may be used in a wide range of applications, including the detection of cells or macromolecules, or for monitoring reactions or cell culture growth.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-506257

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)7月13日

(51)Int.Cl.*
C 12 M 3/08
1/34
G 01 N 33/50

識別記号 広内整理番号
9050-4B
A 7229-4B
P 7055-2J

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平5-519504
(86)(22)出願日 平成5年(1993)4月29日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)10月28日
(86)国際出願番号 PCT/US93/04018
(87)国際公開番号 WO93/22055
(87)国際公開日 平成5年(1993)11月11日
(31)優先権主張番号 877,536
(32)優先日 1992年5月1日
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 877,661
(32)優先日 1992年5月1日
(33)優先権主張国 米国(US)

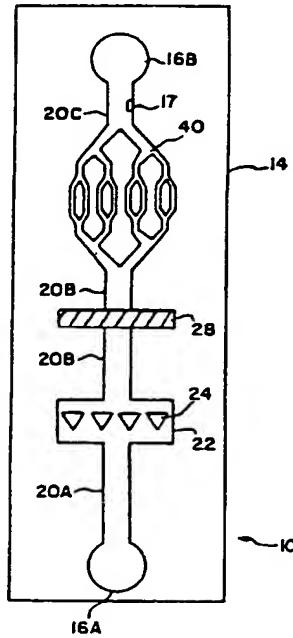
(71)出願人 ト拉斯ティーズ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ペンシルベニア
アメリカ合衆国19104ペンシルベニア州、
フィラデルフィア、スイート300、マーケット・ストリート3700番
(72)発明者 ワイルディング、ピーター
アメリカ合衆国19301ペンシルベニア州、
パオリ、ダービー・ロード208番
(72)発明者 クリッカ、ラリー・ジェイ
アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州、
パーク、ネイサン・ヘイル・ロード
886番
(74)代理人 弁理士 青山 葉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微細加工した分析装置における流体の取扱い

(57)【要約】

細胞を含有する流体試料を分析するための装置を開示する。該装置は、少なくとも1つの試料流入ポート(16A)およびメソスケール流動システム(20)を形成するように微細加工した固体基材(14)よりなる。該メソスケール流動システム(20)は、流入ポートから伸びる試料流動チャンネル(20)と、該流動チャンネルと流体連絡して設けられた、細胞処理のための細胞取扱い領域を含む。該装置は、さらに、該流動システムを通じて該試料中の細胞の流動を誘起するための手段も含む。一の具体例において、該細胞取扱い領域(22)は細胞溶解手段(24)よりなり、例えば、細胞試料中の細胞内成分を検出する前に、試料中の細胞を溶解することができる。もう一つの具体例において、該細胞取扱い領域は、細胞試料中の特異的集団の細胞に可逆的に結合して、試料から該特異的細胞集団を単離することを可能とする結合領域となるものとすることができる。該装置は、細胞を含有する流体試料分析のために、広範囲の自動化され、敏感で迅速なテストで利用することができる。



請求の範囲

1. 流体、細胞を含有する試料を分析するための装置であって、:
 - 試料流入ポートと；
 - 該流入ポートから伸びる試料流動チャンネル；および
 - 該流動チャンネルと流体連絡して設けられた細胞を処理するための細胞取扱い領域からなるメソスケール流動システム；
 - とを形成するように微細加工された固体基材よりなる該装置。
2. さらに、該メソスケール流動チャンネルおよび該細胞取扱い領域を通しての該試料中の細胞の流動を誘起させるための手段よりなる請求項1記載の装置。
3. 該細胞取扱い領域が細胞溶解手段よりなり；
- ここに、流動を誘起させるための該手段を用いて、該試料中の細胞を該細胞溶解手段と細胞膜破壊的接触させ、それにより、該試料中の細胞を溶解する請求項2記載の装置。
4. 該細胞溶解手段が、その壁から伸びる細胞貫通突起物を有する流動チャンネルの部分よりなる請求項3記載の装置。
5. 該細胞溶解手段が、該細胞取扱い領域の中に捕獲された脱いエッジの粒子よりなる請求項3記載の装置。
6. 該細胞溶解手段が、細胞の通過を阻害するが、細胞内分子を通過させるのに十分な制限された断面寸法の領域よりなる請求項3記載の装置。
7. さらに、該試料中の細胞の細胞内分子成分の存在を検出するための、該細胞溶解領域の下流にある手段よりなる請求項3記載の装置。
8. さらに、不溶性の細胞夾雑物を収集するための、該細胞溶解手段の下流に設けられた手段よりなる請求項3記載の装置。
9. さらに、該細胞溶解手段の下流に設けられた漏過手段よりなる請求項3記載の装置。
10. 該基材が、さらに、少なくとも2つのさらなるポートと連絡した分岐メソスケール流動チャンネルを形成し、該装置が、さらに、該流動チャンネルのう

に、該液体を該基材の流動システムに通すための、該器具に設けられている、ポンプ手段よりなる請求項2記載の装置。

11. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具よりなり、該器具が：
該基材を保持するための手段；および
該基材中の該メソスケール流動システムの内容物を観察するための光学的手段よりなる請求項2記載の装置。
12. 該光学的手段が、拡大する光学機器およびビデオカメラよりなり、ここに、該器具が、さらに：
該装置の角度および位置を手動で調整するための傾斜機構；および
該流動システムの内容物を観察するためのビデオスクリーン
よりなる請求項1-8記載の装置。

20. 流体試料を分析するための装置であって：

- 試料流入ポート；
- 該流入ポートから伸びた試料流動チャンネル；
- 該流動チャンネルと流体連絡した分岐チャンネル；および
- 各々が、該流動チャンネルおよび該分岐チャンネルの間、ならびに該流動システムの外部に連絡する少なくとも2つのさらなるポート；および
- 該流動システム内に含有されている試料中の分析物の存在または濃度を示すデータを光学的あるいは電気的に収集するための検出領域よりなるメソスケール流動システムを形成するように微細加工された固体基材；および
- 該流動システムを通る流動を、該さらなるポートのうち選択された1つに向けるためのバルブ手段よりなる該装置。

21. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具よりなり、該器具が：
該基材を保持するための手段；
- 該基材が該保持手段中に保持されている場合に、該ポートのうち少なくとも2つに連絡している流体流動チャンネル；および
- 該流動システム内で流動を誘起するためのポンプ手段よりなる請求項20記載の装置。

特表平7-506257 (2)

ち選択された1つの内に流体流動を向けるバルブ手段よりなる請求項2記載の装置。

1. 該細胞取扱い領域が；
該細胞試料中の該細胞集団の予め選択された細胞表面分子に可逆的に結合する固定化された結合部位よりなる細胞捕捉領域よりなり；
ここに、該細胞含有試料の流動を誘起するための該手段を用いて；
該結合部位によって該細胞集団中の細胞の捕捉を可能とし、それにより、該試料から該細胞集団を分離するのに十分速い第1の流速；および
該分離された細胞を該捕捉領域から放出するのに十分な第2の速い流速にての流動を誘起する請求項2記載の装置。
2. 該流動システムが、さらに、該試料の細胞外成分の存在を検出するための、該細胞捕捉領域の下流にある手段よりなる請求項1-1記載の装置。
3. 該流動システムが、さらに、該細胞捕捉領域から下流にある細胞溶解手段よりなり、ここに、該流動誘起手段が、細胞を該細胞溶解手段へ押し込むための手段を含むし、それにより、該試料中の細胞を溶解し；
該装置が、さらに、該捕捉された細胞中の細胞内成分の存在を検出するための手段よりなる請求項1-1記載の装置。
4. さらに、該試料から細胞夾雑物を通過するための、該細胞溶解手段および該検出手段の間に設けられたフィルター手段よりなる請求項1-3記載の装置。
5. 該基材が、さらに、十分に小さな直径の細胞のみを通過させる制限された大きさの複数の流動経路を形成する手段からなる細胞ふるいを形成する請求項2記載の装置。
6. 該基材が、微細加工されたシリコンよりなる請求項1記載の装置。
7. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具よりなり、該器具が：
該基材を保持するための手段；および
該基材上の流入ポートと適合する流体投入手段
よりなり；
ここに、流動を誘起するための該手段が、流体が該保持手段に保持される場合

22. 該バルブ手段が該器具内に設けられている請求項2-1記載の装置。

23. 流体試料を分析するための装置であって；
その各々が流動チャンネルおよび分析物検出領域よりなり、該流動システムの1つが試料を分析するために適合したものであり、他のものが対照として適合するものである、少なくとも2つのメソスケール流動システムを形成するように微細加工された固体基材；および

該流動システムを両方を通る試料の流動を実質的に同時に誘起し、それにより、該システムの検出領域からのデータと比較することができる手段よりなる該装置。

24. 流体試料を分析するための装置において、試料流入ポートと、該ポートおよび分析物検出領域の間で連絡する試料流動チャンネルよりなるメソスケール流動システムとを形成するように微細加工された固体基材よりなる装置であって、改良点が：

分析物を検出する前に該試料から不溶性物質を除去するため、該検出領域の上流に、該流動チャンネル中に設けられたフィルターによる該装置。

25. さらに、該フィルターに隣接して設けられた、不溶性の夾雑物を収集するための排水槽よりなる請求項2-4記載の装置。

26. (A) 標的細胞集団に特徴的な細胞膜結合タンパク質に特徴的な結合蛋白がその上に固定化された固体壁よりなるメソスケール試料流動経路を供し；

(B) 可逆的な細胞表面タンパク質-固定化タンパク質結合により、細胞膜の亞集団の膜は捕獲でき、一方他の細胞はそれを通過させる条件下において細胞含有液体試料を該流動経路に通し；次いで、

(C) 標的細胞集団を放出させるために該流動経路における条件を変化させる工程よりなることを特徴とする細胞含有液体試料中の標的細胞集団を分離する方法。

27. 該流動経路中の流体の該流動速度を工程Cで増大させて、該固体壁から細胞を剪断により除く請求項2-6記載の方法。

28. 工程Cを、該細胞を該固体壁から脱着させる溶媒を、該流動チャンネルに導入することによって行う請求項2-6記載の方法。

特表平7-506257 (3)

明細書

微細加工した分析装置における流体の取り扱い

関連出願の相互参照

本出願は、(出典明示して本明細書の一部とみなす)以下の関連する同時係属出願: 1992年、5月1日に出願した米国特許出願第07/877.702号; 1992年、5月1日に出願した米国特許出願第07/877.701号; 1992年、5月1日に出願した米国特許出願第07/877.622号; および 1992年、5月1日に出願した米国特許出願第07/877.661号と同時に出願されているものである。

発明の背景

本発明は、一般に、分析を行うための方法および装置に関する。さらに詳細には、本発明は流体試料を分析できる小型で、典型的には一回使用のモジュールのデザインおよび構成に関する。

最近の数十年間に、技術により、生物試料の分析を行うための膨大な数のプロトコル、テストキットおよびカートリッジが、種々の診断およびモニターの目的で発展してきた。イムノアッセイ、凝集アッセイ、およびポリメラーゼ鎖反応に基づく分析、種々のリガンド-受容体相互作用、ならびに複合体試料の分別移動、これらすべては、種々の生物化合物もしくは汚染物の存在または濃度、あるいは特定の細胞型の存在を検出するのに用いられてきた。

最近、生物試料を取り扱い、ある種の臨床試験を行うための小型でディスポーバブルな装置が開発された。ショージ(Shoji)らは、シリコンウェハー上に加工された小型血液気体分析器(miniature blood gas analyzer)の使用を報告している(ショージ(Shoji)ら、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators)、第15巻:101-107頁(1988年))。サト(Sato)らは、マイクロ機械加工シリコン装置(micromechanical silicon device)を用いた細胞融合技術を報告している。(サト(Sato)ら、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators)、A21-A23:948-953頁(1990

年))。コロンブス(Columbus)らは、生物流体の毛細管流動の制御下に、2つの直交した向きのv-溝付きのエンボス加工を施したシートよりなるサンドウィッチ構造を利用して、実験的なマルチ-チャンネルテスト装置において、イオン選択性電極を離散させている(コロンブス(Columbus)ら、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、第33巻:1531-1537頁(1987年))。

マスダ(Masuda)らおよびワシズ(Washizu)らは、(例えば、細胞融合等の)細胞操作用の流体運動チャッパーの使用を報告している(マスダ(Masuda)ら、Proceedings IEEE/IAS Meeting、1549-1553頁(1987年); およびワシズ(Washizu)ら、Proceedings IEEE/IAS Meeting、1735-1740頁(1988年))。当該分野では、生物流体の分析および微生物の検出を行うためのメソスケール装置を用いる可能性が未だ十分には開拓されていない。

微生物の検出に利用されている最近の分析技術は、ほとんど自動化されておらず、通常、適当な培地でインキュベートして生物数を増加させる必要があり、必ず視覚的および/または化学的方法を用いて菌株または亞種を同定する。かかる方法に固有の遅延は、しばしば、感染の性質の確定的な同定の前に、医学的介在(medical intervention)を要する。産業、公衆の健康または臨床的な環境においては、かかる遅延は重大な意義をもつ。迅速な微生物検出のための簡便なシステムに対する要望がある。

本発明の目的は、マイクロ容量の試料で分析でき、非常に低濃度で存在する物質を検出でき、分析結果を迅速に出せる最適な反応条件を有する分析システムを提供することにある。もう1つの目的は、生物的および他の適用の範囲において、迅速に、自動化された分析が可能なメソスケールの機能性要素を有し、容易に大量生産でき、ディスポーバブルで、(例えば、1cc容量より少ない)小型の装置を提供することにある。本発明のさらなる目的は、食品、水または体液中において、迅速な臨床テスト、例えば、細菌の汚染、ウイルスの汚染、精子の運動性、血液パラメーター、汚染物のテストを簡便に行うことができるかかる装置類を提

示する)。チバ・コーニング・ダイアグノースティクス・コーポレーション社(米国)(Ciba Corning Diagnostics Corp.)は、凝血を検出するためのマイクロプロセッサーで制御されたレーザーフォトメーターを製造している。

マイクロ機械加工技術は、マイクロエレクトロニクス産業に発祥するものである(アンゲル(Angell)ら、サイエンティフィック・アメリカン(Scientific American)、第248巻:44-55頁(1983年))。マイクロ機械加工技術は、(生物細胞の寸法である)数十ミクロンないし(生物のいくつかの巨大分子の寸法である)ナノメーターの最小寸法範囲の構造要素を有するマイクロ設計された装置の製造を可能とした。本明細書中においては、この大きさを「メソスケール(mesoscale)」という。メソスケール構造を包含するほとんどの実験は、マイクロ機械学、例えば、機械的動作および流動特性等の研究を含有する。メソスケール構造の潜在的な可能性は、生命科学分野においては、未だ、十分には開拓されていない。

ブルネット(Brunette)は、シリコン、チタン被覆したポリマー等の層における線維芽細胞および上皮細胞の挙動を研究した(ブルネット(Brunette)、エクスペリメンタル・セル・リサーチ(Exper. Cell Res.)、第167巻:203-217頁(1986年)および第164巻:11-26頁(1986))。マッカートニー(McCartney)らは、涙を付けたプラスティック基材中の腫瘍細胞の挙動を精査した(マッカートニー(McCartney)ら、キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)、第41巻:3046-3051頁(1981年))。ラセル(LaCelle)は、微小血管中の白血球および赤血球の流動を研究して、微小血管中の洞を行った。(ラセル(LaCelle)、ブラッド・セルズ(Blood Cells)、第12巻:179-189頁(1986年))。ハング(Hung)およびバイスマン(Weissman)は、マイクロ機械加工したチャンネルにおける流体力学の研究を報告しているが、分析装置に関連するデータは得ていない(ハング(Hung)ら、メディカル・アンド・バイオロジカル・エンジニアリング(Med. and Biol. Engineering)、第9巻:237-245頁(1971年); およびバイスマン(Weissman)ら、アム・インスト・ケム・エンジニアリング(Am. Inst. Chem. Eng. J.)、第17巻:25-30頁(1971

供することにある。

発明の概要

本発明は、流体試料を分析するための方法および装置を提供する。該装置は、試料流入ポートおよびメソスケール流動システムを形成するために細胞加工された、典型的には、数ミリメートー単位の厚さであって、約0.2ないし2.0平方センチメーターのオーダーの固体基材よりなる。該メソスケール流動システムは、流入ポートから伸びる試料流動チャンネル、および、該流動チャンネルに流体連結した流体取扱い領域を含有する。本明細書中においては、「メソスケール」なる語は、0.1μmないし500μmのオーダーの断面寸法を有するチャッパーおよび流動経路を定義するのに用いる。該メソスケール流動チャンネルおよび流体取扱い領域は、0.1μmないし100μm、典型的には2~50μmのオーダーの深さを有するのが好ましい。そのチャンネルは、軽ましくは2.0ないし500μm、さらに軽ましくは3ないし100μmのオーダーの幅を有するのが好ましい。多くの適用には、5~50μm端のチャンネルが有用であろう。基材中のチャッパーは、しばしば、さらに大きな寸法、例えば、数ミリメートーとなろう。

一の具体例において、該装置は、細胞を含む流体試料を分析するのに利用してもよく、該流体取扱い領域は細胞取扱い領域よりもよい。さらに、該装置は、該メソスケール流動システムを通じて、試料中の細胞の流動を誘起するための手段を含有していてもよい。該細胞取扱い領域は、細胞溶解手段よりもよい。該流動誘起手段を利用して、細胞試料を該細胞溶解手段に強制的に通して、細胞を破壊することができる。また、該装置内に、該細胞試料中の細胞内分子成分の存在を検出するための手段を設けてよい。該細胞溶解手段は、例えば、細胞取扱い領域中に捕捉させた脱いエッジのシリコン片、または該メソスケール流動システムの該細胞取扱い領域の壁から伸びる細胞膜貫通突起物よりもよい。別法として、減少した断面積の領域は、該細胞溶解手段よりもよい。該流動システムは、さらに、例えば、細胞内分析物の存在を分析する前に、試料からの細胞夾雜物を通過するための微細加工されたフィルターよりもよい。

また、該細胞取扱い領域は、可逆的に細胞表面分子に結合でき、細胞試料からの細胞集団を選択的に単離できる結合部位よりなる細胞捕獲領域よりもよい。また、試料中の細胞または細胞表面分子の存在を検出するための手段を、該細胞捕獲領域の下流に設けてもよい。もう一つの具体例において、該細胞取扱い領域は、大きさによって細胞を分別できる、該領域の壁から伸びるポスト(post)のごとき不活性な遮蔽体よりもよい。また、該ポストは、例えば、精子運動性を検定できる精子試料の流動に対する遮蔽物よりもよい。

一般的には、本明細書に開示するごとき、該固体基材は、メソスケール流動システムを含有するチップよりもよい。該メソスケール流動システムは、確立されたマイクロ機械加工方法を用いて、シリコンおよび他の固体基材から設計し加工することができる。装置中の該メソスケール流動システムは、流動チャンネルおよび1またはそれを超える流体取扱い領域を該基材表面に最細加工し、次いで、例えば、透明なガラスカバーのようなカバーを表面にわたり付着させることによって組み立てることができる。典型的には、該装置は、例えば、該基材またはカバーを通じて流動システムと遮蔽した孔によって形成された流入ポートを通じて該流動システムに導入された、マイクロ容量($<10\mu\text{L}$)の試料を分析するのに適した大きさに設計される。該メソスケール流動システムの容量は、典型的には、 $<5\mu\text{m}$ であろうし、個々のチャンネル、チャンバーまたは他の機能的要素の容量は、しばしば $1\mu\text{m}$ より小さく、例えば、nLまたはpLの範囲であろう。マイクロ容量の試料流体中に(例えば、ナノグラム量)非常に低濃度で存在する細胞または他の成分は、迅速に(例えば、 <10 分)分析できる。

典型的には、該チップは、該チップを保持するための収容部位を含有する器具と共に用いられ、それは、チップ上の1またはそれを超える投入ポートと該器具中の1またはそれを超える流動ラインとかみ合う。特定の細胞型または分子成分を含有すると予想される流体試料、例えば、細胞を含有する流体試料を該基材の流入ポートに適用した後、該チップを該器具に置き、例えば、器具中のポンプを作動させて該試料を該流動システムに通す。別法として、試料は、該器具によっ

て該チップの中に注射してもよい。また、該試料は、毛細管作用によって該流動システムに注入させてもよい。

一の具体例において、細胞、細胞内または他の流体試料成分のごとき流体試料中の分析物の存在を検出するために、該装置の流体取扱いチャンバーは、該流体取扱い領域から下流にメソスケール検出領域を含有してもよい。該検出領域は、(出典明示して本明細書の一郎とみなし)USSN[代理人ファイル番号 UPA 001(8261/2)]、メソスケール・デテクション・ストラクチャーズ(Mesoscale Detection Structures)に従って構成できる。該器具は、検出領域にて電子的または分光光度計の信号を受けて、該細胞試料中の予め選択された成分の存在を示すように設計してもよい。また、検出領域中の細胞、細胞内または他の分析物の存在も、例えば、該検出領域上の透明なカバーのごとき、透明もしくは半透明な窓を通して、あるいは、該基材自体の半透明部分を通して光学的に検出することもできる。該器具は、該検出領域の中の予め選択された分析物の存在を検出できる分光光度計のごときセンサー器具を含有してもよい。一の具体例において、該検出領域は、検出すべき分析物に結合でき、それによって検出を向上し容易にする結合部分よりもよい。また、該検出領域は、フラクタル(fractal)領域、すなわち、出典明示して本明細書の一郎とみなしUSSN[代理人ファイル番号 UPA 002(8261/3)]、アナライシス・ベースド・オン・フロー・レストリクション(Analysis Based on Flow Restriction)に開示されているごとき、流体試料の流動特性の変化に敏感な、順次分岐する流動チャンネルの領域よりもよい。また、該装置には、当該ポートを開閉してメソスケール流動システムを通じての流体流動の制御を可能とするために、該流動システムと流体連結し、例えば、当該装置と組み合わせて用いる器具中にバルブを設けた、少なくとも3つの流入ポートを加工することができる。

該メソスケール装置は、広範な生物学的テストを行うのに適する。該装置のいくつかの特徴および長所を表1に要約する。

装置には、例えば、2またはそれを超える分析を同時に行うことができるようるために各システムに異なる細胞取扱いチャンバーを有し、共通の流入ポー

トによって供給される、2またはそれを超える別の流動システムを包含させることもできる。該装置を利用して、例えば、流体試料中の細胞成分または細胞内成分の存在を検出する迅速なある範囲の試験を行うことができる。該装置を利用して、例えば、病原性細菌もしくはウイルスを検出でき、または細胞を分別することができる。本発明は、広範な分析が可能である方法および装置を提供する。アッセイは迅速に完了し、そのアッセイの終了時には該チップは破棄してもよく、これは、試料間の汚染を防止し、危険な物質を潜在的に除去する点で有利であり、安価なマイクロ試料分析を提供する。

表1

特徴	利点
<u>融通性</u>	チップ数に限度がない設計または選用が利用可能である。
<u>再現性</u>	信頼でき、標準化されたチップの大量生産が可能である。
<u>低コスト生産性</u>	現存するシステムと競合する価格とできる。一回使用工程用のディスポーザブルである。
<u>小型性</u>	大きな器具を要しない。通常でない研究室環境で使用するポートブルなユニットおよびシステムに利用できる。 最低の在庫コストおよび初期コストである。
<u>マイクロスケール</u>	最低の試料容積および試薬容量しか要しない。試薬コスト、高価な特別のテスト工程を特に減じている。単純化された器具機構とできる。
<u>無菌性</u>	微生物アッセイおよび他の清潔な環境を要する工程に用いるために、チップは滅菌できる。
<u>密閉システム</u>	バイオハザードは最小限に止められる。工程の完全性を保証する。
<u>多重循環性能</u>	単一のチップで多工程または複数の分析を行うことができる。パネルアッセイができる。

マルチ検出性能 実質的にいずれのシステムをもモニターするアッセイおよび工程の可能性を拡張する。広範な通用が可能である。
再使用可能なチップ ある種の通用については、使用者により、工程当たりのコストを削減する。

図面の簡単な説明

図1は固体基材14を含有する本発明の装置の拡大平面図であり、該固体基材には、流入ポート16、メソスケール流動チャンネル20、細胞溶解チャンバー22およびフラクタル領域40が加工されており、該基材の表面には透明カバー12が取り付けられている。

図2は図1に示した該装置の長手方向の断面図である。

図3は図1に示した該装置の斜視図である。

図4は当該装置10を支持し、該装置10中の試料流体の圧力を調整し検出するのに用いる器具50内に収容した分析装置10の模式図である。

図5は該流動チャンネルの壁から伸びる細胞または細胞夾雑物を通過する突起物26を有する不活性基材14上の流体取扱い領域22の断面図である。

図6は該チャンネルの壁から伸びる細胞貫通突起物24を有する不活性基材14上の流体取扱い領域22の断面図である。

図7は細胞分別、細胞溶解およびPCR分析を有する種々の機能を行なうのに適当な一連のメソスケールチャンバーが加工された分析装置10の模式的な上面図である。

図8ないし図10はメソスケール流動チャンネル20中に微細加工したフィルターの異なる具体的な例を示す。

図11は装置10の内容物を観察するため、装置10と組み合わせて用いる器具60の模式的な斜視図である。

図12は図11の器具60の模式的な断面図である。

各図面中の同様の参照記号は対応する部分を示す。

発明の詳細な説明

特表平7-506257 (5)

本発明は流体試料を分析するための方法および装置を提供する。該装置は、試料流入ポートおよびメソスケール流動システムを形成するように微細加工された固体基材よりもなる。該メソスケール流動システムは、該流入ポートから伸びる試料流動チャンネルと、該流動チャンネルと流体連絡した流体取扱い領域となりる。一の具体例において、該装置は細胞を含有する流体試料を分析することができる。該装置は、例えば、細胞試料中の細胞成分または細胞内成分の存在を検出するのに用いることができる。

メソスケール流動チャンネルおよび細胞取扱いチャンバーを有する分析装置は、固体基材材料から設計でき、大量に加工できる。それらは容易に試験できる。その正確で効率的な加工が可能なよう発達した技術のため、シリコンが好ましい基材材料であるが、ポリテラフルオロエチレンのごときポリマーを含有する他の材料を用いてもよい。該試料流入ポートおよび他のポート、試料流動チャンネルおよび流体取扱い領域を含有する該メソスケール流動チャンネル、ならびに、他の機能性要素は、当業者に公知のいずれの種々のマイクロ機械加工方法によっても、シリコン基材から大量で安価に加工することもできる。利用できる該マイクロ機械加工方法は、スピンドルティング法および化学気質蒸着のごときフィルム蒸着工程、レーザー加工またはUVもしくはX線工程のごときフォトリソグラフ技術、あるいは、湿式プロセスまたはプラズマプロセスいずれかによるエッチング法を包含する(例えば、マンズ(Manz)ら、トレンズ・イン・アナリティカル・ケミストリー(Trends in Analytical Chemistry)、第10巻:144-149頁(1991年)参照)。

変化する幅および深さの流動チャンネルをメソスケール寸法で加工できる。加工されたメソスケール流動チャンネルを含有する該シリコン基材は、傳くアノード的に結合したガラスカバーで被覆または密閉されていてもよい。他の透明または不透明な被覆材料を用いてもよい。別法として、2つのシリコン基材をサンドウィッチしてもよく、あるいは、シリコン基材を2つのガラスカバー間に挟み込んでよい。透明なカバーを用いることにより、該チャンネル内容物の動的な観察が容易となる窓が得られ、該メソスケール流動システムを光学的に観察するに適する。

なる、細胞溶解領域と流体連絡した、メソスケール流動システム中に微細加工されたメソスケール検出領域を包含させることもできる。結合部分は、該検出領域と流体連絡した流入ポートを介して該検出領域中に導入することができる。別法として、結合部分は、該チャンネル表面上への物理的吸着、または、該チャンネル表面もしくはポリマービーズのごとき固着反応物への共有結合のいずれかにより該検出領域中に固定化することができる。当該分野で利用できる技術を利用して、珪質表面を化学的に活性化し、続いて結合部位を該表面へ結合させてもよい(例えば、ソリッド・フェーズ・バイオケミストリー(Solid Phase Biochemistry)グリュ・エイチ、コウテン(W. H. Scouten)編、ジョン・ワリー(John Wiley)、ニューヨーク(New York)中のハーラー(Haller)、535-597頁(1983年);およびマンデニアス(Mandenius)ら、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第137巻:106-114頁(1984年)、およびアナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第170巻:68-72頁(1988年)参照)。

該検出領域中の結合部位は、例えば、抗原結合タンパク質、DNAプローブ、あるいはリガンド/受容体対のうちの一方よりもなるものでよく、抗原、ポリヌクレオチドまたは細胞表面分子のごとき予め選択された細胞、細胞内または他の分析物を検出することができる。検出領域中で利用される当該分野で用いられる該結合アッセイは、イムノアッセイ、酵素的なアッセイ、リガンド/バインダー・アッセイおよびDNAハイブリダイゼーションアッセイを含有する。特定の細胞内分析物の検出は、検出領域中の適当な結合部位を選択することにより行うことができる。該検出領域は、(出典明示して本明細書の一部とみなす)USSN[代理人ファイル番号 UPA001(8361/2)]、メソスケール・ディテクション・ストラクチャー(Mesoscale Detection Structures)に開示されている方法に従って加工することができる。

また、該メソスケール検出領域は、該流体試料中の予め選択された細胞、細胞内または他の分析物の存在により誘起される流動性質の変化に敏感な領域からなるものとすことができる。該流動感受性領域は、例えば、複数の第二の流動チャ

ることが自視または機械的に可能となる。他の加工アプローチを用いることもできる。

該装置の容量は非常に小さく、従って、分析に要する試料流体の容量は小さい。例えば、10ミクロン幅×10ミクロン深さ×1cm(10⁴ミクロン)長さである500個の溝のアレイをその表面に有する1cm×1cmのシリコンにおいて、各溝の容量は10⁻³μlであって500個の溝の全容量は0.5μlとなる。小容量の該メソスケール流動システムにより、非常に小さな容量(5μl)の液体試料でアッセイを行うことが可能となる。該装置のメソスケール流動システムは、マイクロリッカー容量、あるいはナノリットルまたはそれ未溝にて微細加工することができ、これにより該アッセイに要する試料および/または試薬流体の容量が有利に限定される。一の具体例において、顕微鏡写真を、該基材上のメソスケール流動システムを加工するためのマスクとして使用することができる。メソスケール流動システムは、このような大きさおよび立体配置の範囲にて加工することができる。

一の具体例において、該装置は細胞を含有する流体試料を分析するのに利用することができる。該流体取扱い領域は、一の具体例において、mRNAまたはDNA分子のごとき細胞内分子の分析前に流体試料中の細胞を溶解できる細胞溶解手段よりなっていてもよい。図6に示すように、該細胞溶解手段は、細胞取扱い領域22の表面から伸びる細胞膜貫通突起物24よりなっていてもよい。該装置は、該流動システムを通じての流動を誘起するためのポンプのごとき手段を含有してもよい。流体流動が貫通突起物24を通して押込まれると細胞が破壊される。細胞死産物は、該細胞溶解手段から下流の該流動システム中に微細加工されたフィルターを用いて識別することができる。また、該細胞溶解領域は、該細胞取扱い領域に捕捉された、例えば、シリコンから加工した脱いエッジの粒子よりもよい。加えて、該細胞溶解手段は、制限された断面寸法の領域よりもなっていてもよく、これにより十分な流動圧の適用で細胞溶解を行える。もう一つの具体例において、該細胞溶解手段は、細胞溶解剤よりもよい。

該装置は、細胞試料中の選択された細胞内分子成分と結合できる結合部位より

シルに至る分岐部よりもなるフラクタル領域からなっていてもよい。該流動感受性領域、例えば、該フラクタル領域は、(出典明示して本明細書の一部とみなす)関連する係属出願、米国特許番号[代理人ファイル番号 UPA002(8261/3)]アナリシス・ペースト・オン・フロー・リストリクション(Analysis Based on Flow Restriction)により構成することができる。

該装置は、例えば、細胞を含有する流体試料中の予め選択された細胞内または細胞表面の部位を検出することができる複数の流体取扱い領域からなるものとすることもできる。一の具体例において、該メソスケール流動システムには、細胞溶解手段、細胞夾雑物を通過するためのフィルター、および、検出領域を微細加工することができる。該フィルターは、該細胞溶解手段および該検出領域の間の該流動システム中に微細加工されていてもよく、該検出領域中の細胞内分析物の検出前に、試料からの溶解された細胞膜および他の細胞夾雑物を除去することができる。該流動システム中に微細加工されていてもよいフィルターは、図8ないし図10に示したフィルター80を含有する。図8ないし図10に示した該装置10において、該フィルター80は、該流動チャンネル20Aおよび20Bの間に微細加工され、チャンネル20A中の試料流体が該フィルター80を通過するのを可能にする。その通液は、例えば、メソスケール検出領域中の、狭く下流での分析の前に、フィルター80を通りチャンネル20Bに出て行く。フィルター80は、チャンネル20に比して小さな直径のメソスケール流動チャンネルであり、0.1ないし2.0μmのオーダーの深さおよび幅で微細加工する。対照的に、該流動チャンネル20Aおよび20Bは、最大約500μmのオーダーの大きな幅および深さを有する。フィルター80の小さな直径により、該試料からの剪断された細胞膜および他の細胞夾雑物を通過することができる。図5に示す該流動チャンネル20の壁から伸びるポスト26のごとく、他のフィルター手段を用いることもできる。

該検出領域における分析物の存在は、該装置中の流動システムの選択された領域における試料流体の圧力または電気電導度をモニターすることを含む多くの方法か、あるいは、視覚的または機械により透明なカバーまたは基材自体の

特表平7-506257 (B)

半透明な部分のいずれかを通じての光学的な検出によって検出できる。該検出領域中の分析物の検出は、(出典明示して本明細書の一部とみなす)関連する関係出願USSN[代理人ファイル番号 UPA001(8261/2)]、メソスケール・ディテクション・ストラクチャーズ(Mesoscale Detection Structures)、およびUSSN[代理人ファイル番号 UPA002(8261/3)]、アナリシス・ベースド・オン・フロー・リストリクション(Analysis Based on Flow Restriction)に開示されているごとくに行う。バルブ、メソスケール圧力センサー、および他の機械的なセンサーのごとき装置は、シリコン基材に直接加工することができ、確立された技術に従って大量生産することできる(アンゲル(Angell)ら、サイエンティフィック・アメリカン(Scientific American)、第248号:44-55頁(1983年))。また、圧力センサーおよび他の検出手段も、該装置と組み合わせて利用する器具中に設けることができる。

もう一つの具体例において、該流体取扱い領域は、細胞を含有する流体試料からの予め選択された細胞集合を分離するための細胞捕捉領域よりもよく、細胞上または細胞内の巨大分子、あるいは細胞外流体中の成分の下流での分析ができる。該細胞捕捉領域は、タンパク質のごとき特徴的な細胞表面分子を介して標的細胞に可逆的に結合できる部位よりもよい。一の具体例において、該細胞捕捉領域は、細胞を含有する流体試料から予め選択された細胞集団を単離するのに利用できる。この具体例において、該装置には、ポンプのごとき該流動システムを通じて該試料の流動を誘起するための手段を設ける。低流動圧では、細胞は該細胞捕捉領域中で該結合部位に結合する。次いで、流動を除けて、例えば、緩衝液の流動で該細胞を洗浄する。高流速かつ高流動圧では、洗浄した細胞が該分離領域から放出され、分析のために下流に、例えば、メソスケール検出領域へと移動する。もう一つの具体例において、細胞外流体が下流へと流動し、例えば、メソスケール領域中で分析される間に、該細胞は固定化されたままである。また、該細胞は該細胞捕捉領域の壁から脱着できる特異的溶解を流動システムを通して流動させることにより、該結合している細胞を該細胞捕捉領域から除去できる。

突起物24を設ける。試料流体は流入ポート16Aを通して該流動システムに添加することができる。次いで、該装置のポンプを用いて、細胞試料を流動チャンネル22Aを通して細胞溶解チャンバー22に入れてもよい。次いで、溶解された細胞試料をフィルター28を通して通過し、フラクタル検出領域40を通してポート16Bに向かって流動させる。該基材14は、ガラスまたはプラスチックの窓12で被覆されている。細胞内分析物の存在は、特定の細胞内分析物により誘導される該フラクタル検出領域40の流動制限を、例えば、光学的に検出することにより示される。該フラクタル領域は、フラクタル領域40における流動制限を増強するために、分析物に結合できる結合部位を包含させることができる。

該メソスケール流動システムを含有する分析装置は、該装置に流体をデリバリーし、該装置から流体を受けるため、図4に模式的に示す器具50のごとき器具と組み合わせて用いることができる。その器具には、装置10を保持し、装置上の、例えば、ポート16のようなポートと合わせるための収容部58を該器具中の流動ラインと共に組み込む。該器具は、該細胞を含有する試料を細胞溶解手段へ押し込み、十分な流動圧を付して細胞溶解を起こさせるポンプのごとき手段を含有してもよい。特定の細胞分析物を含有すると予想される細胞を含有する流体試料を、該器具の流入ポート51に適用した後に、ポンプ52を作動させて試料を装置10の該流動システム20を通して押し込む。別法として、用いる分析装置に応じて、該試料は該装置に注射してもよいし、あるいは、毛細管現象によって単純に該流動システムに注入してもよい。一の具体例において、該装置の該流動システムは、水力学的に十分な用量まで満たしてもよく、該器具を利用して該流動システムを通る流体流動を方向付けてもよい。

また、該分析装置は、該装置中の該メソスケールチャンネルの内容物を観察するための器具と組み合わせて用いることができる。一の具体例において、該器具は、当該装置中のメソスケールチャンネルの内容物を観察するための顕微鏡よりもなるものとすることができる。もう一つの具体例において、図11および12に模式的に示す器具60のように、該器具はカメラを含有してもよい。該器具60には、ハウジング62、観察スクリーン64およびチップを該器具に挿入するた

めのスロット66を設ける。図12の断面図に示すごとく、該器具60には、ビデオカメラ68、光学システム70、および装置10を保持し、装置10の位置および角度を手動で調整できる傾斜機構72も含有させる。該光学システム70は、該チャンネル内容物を拡大するためのレンズシステム、ならびに光源を含有していてもよい。該ビデオカメラ68およびスクリーン64は、流動特性または色調のごとき試料流体特性における分析物誘起変化が、視覚的にモニターでき、所望により器具を用いて記録できるようにする。

本発明の装置は、種々の自動化された、敏感で迅速な流体試料の分析を行うのに用いることができる。該装置は、1つの流動システム中に一連の流体取扱い領域を加工してもよく、マイクロ容量スケールの流体細胞含有試料の迅速かつ効率的な多段階分析を可能とする。また、該装置は、例えば、共通の流入ポートを有する、2またはそれを超える別々の流動システムを含有させることができ、そこでは、分析の間に得られたデータを対照流動システムからのデータと比較できるよう一つの流動システムが対照として適用される。かくして、一定範囲の分析を1つの装置で行うことができる。

一の具体例において、本発明の装置は、3もしくはそれを超える流入ポートおよび該ポートに流体連絡した分岐流動チャンネルよりもなるものとすることができる。該装置には、ポートを開閉して流動システムを通じての流体の流動を制御するためのバルブを器具中に設けることができる。図7に模式的に示す装置10に示すごとく、ポート16A、16B、16Cおよび16Dは、例えば、該装置と組み合わせて用いる器具の中のバルブ手段により独立して開閉し、該流動システム中の流体を、例えば、ポート16を介して、外へ向けるか、または、別法として、該フラクタル検出領域40およびポート16Dに向ける。

本発明は、以下の限定されない実施例からさらに理解されよう。

実施例1

(図5の断面図に示す)7μm間隔を有する遮蔽物26を含有するチャンネルを、HTF-BSA培地で満たし、精液試料を流入ポートに適用する。遮蔽物を通る精子の進行を精子の運動性の指標として供し、対照試料と比較する。

特表平7-506257 (7)

実施例2

図7は、生物学的な流体試料の混合物中の細胞の亞集団から核酸を分離し検出するに用いる基材14を含有する装置10を模式的に図示する。装置10上には、細胞分離チャンバー22A、細胞溶解チャンバー22B、遮断領域28、セクション22Cおよび22Dよりなるポリメラーゼ鎖反応(PCR)チャンバー、およびフラクタル検出領域40を包含するメソスケール流動経路20を微細加工する。また、該メソスケール流動システム20には、流入ポート/排出ポート16A、16B、16Cおよび16Dを設ける。該装置は、図4に示す器具50のごとき器具と組み合わせて用いる。該器具には、該装置中のポート16に通ずる流動経路、および該ポート16を機械的に開閉するバルブを設ける。また、該器具には、該装置を通る試料液体の流動を調整するためのポンプ52も含有させる。該器具には、さらに、該装置中のPCR反応チャンバー部分22Cおよび22Dを加熱するための手段も含有させる。

最初に、器具中のバルブを用いて、ポート16Cおよび16Dを閉じる一方で、該ポート16Aおよび16Bを開ける。該器具中のポンプ52によって、細胞混合物を含有する試料を試料流入ポート16Aに向か、該メソスケール流動経路20を通して分離チャンバー22Aに流動させる。チャンバー22Aは、該チャンバーの壁に固定化された結合部位を含有し、これは該試料中の所望の型の細胞上の表面分子に選択的に結合する。残りの細胞成分は、ポート16Bを介して該基材から排出される。所望の細胞集団がチャンバー22A中に結合した後に、緩衝液を流し抜け、洗浄して、該細胞集団の単離を確実とする。次に、ポート16Bを閉め、16Cを開ける。次いで、流動を十分に増加させて、該固定化された細胞を追い出す。流動を抜け、細胞を覆す通突起物24を通して細胞をチャンバー22Bへ押し込み、これによって該細胞が破れて細胞内物質が放出される。

試料流動をフィルター28を通過させて乾燥し、これにより、大きな細胞膜成分および他の夾雑物を除去して、流動チャンネル20BによってPCRチャンバー部分22Dに結合した該メソスケールPCRチャンバーセクション22Cまで至らしめる。次いで、該PCRアッセイに要するTaqポリメラーゼ、プライマー

および他の試薬を、該器具中の対応するポートおよび流動経路からポート16Cを通してセクション22Dへ添加し、細胞の分離された亞集団からの細胞内可溶性成分およびPCR試薬が混合される。ポート16Aを閉じて、ポート16Bを介して結合した該器具中のポンプを用いて、該PCR試料および試薬を、それぞれ94°Cおよび65°Cに設定したセクション22Cおよび22Dの間に、流動チャネル20Bを通して循環させて、複数のポリヌクレオチド触解および重合サイクルを行い、生成物ポリヌクレオチドが増幅される。該メソスケールPCR分析は、(出典明示して本明細書の一部となす)USSN[代理人ファイル番号UPA 004(8261/5)]、メソスケール・ポリヌクレオチド・アンプリフィケーション・アナリシス(Mesoscale Polynucleotide Amplification Analysis)に開示されている方法により行う。

次いで、該器具中のバルブを用いてポート16Cを閉じ、ポート16Dを開く。次いで、ポート16Bに結合した器具中のポンプを用いて、該細胞集団から単離した増幅ポリヌクレオチドをフラクタル検出領域40へ向ける。該フラクタル検出領域40中の流動制限を、増幅されたポリヌクレオチド生成物の存在の陽性指標として供し、該検出領域にわたって設けられたガラスカバーを通して光学的に検出する。

前記したものは模式的な方法により記載されているもので、本発明が、本明細書中に記載した構造および方法の意図の範囲内の他の形態をとりうることは理解されよう。当業者なら変形および修飾が想い付であろうし、かかる全ての変形および修飾は請求の範囲に定義したことなく本発明の一部分と考えられよう。

FIG. 1

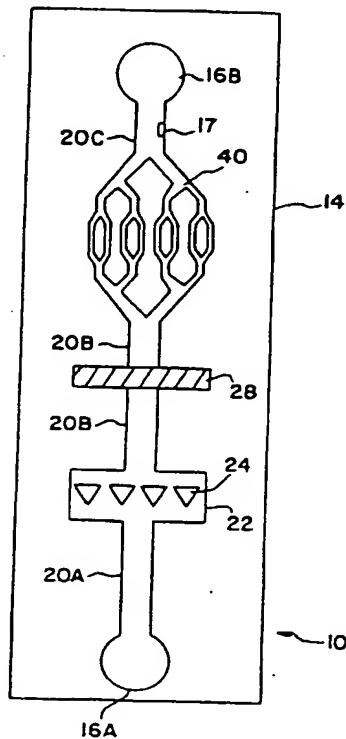


FIG. 2

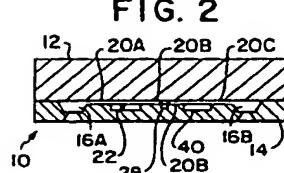


FIG. 3

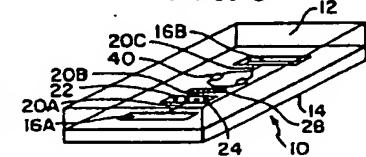


FIG. 4

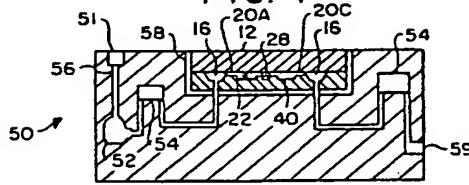


FIG. 5

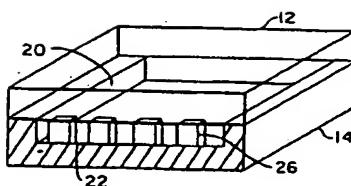


FIG. 6

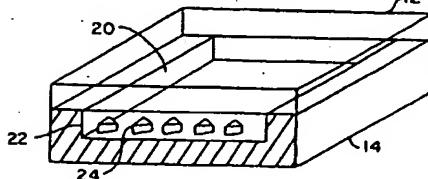


FIG. 7

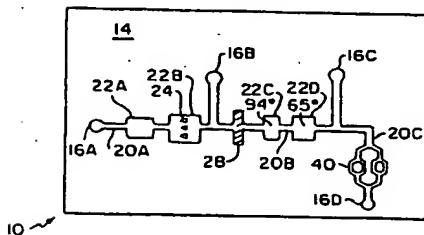


FIG. 12

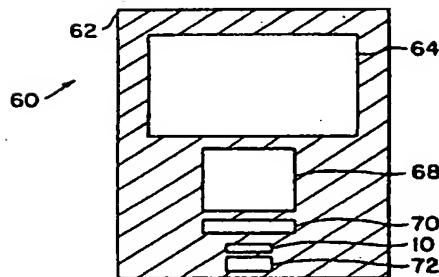


FIG II

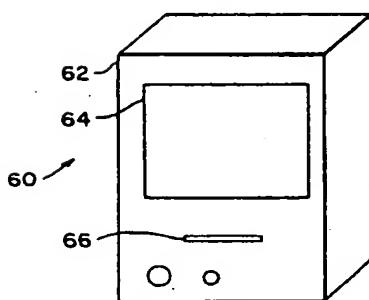


FIG. 8

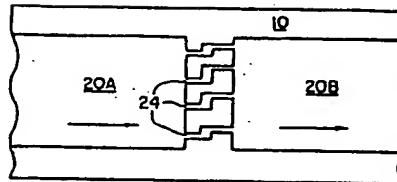


FIG. 9

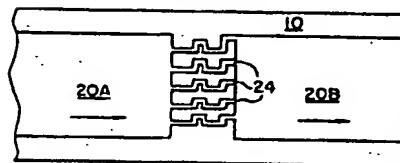
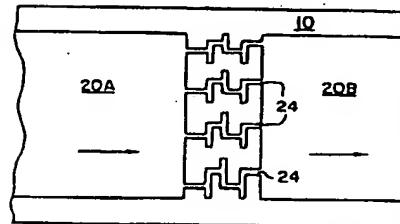


FIG. 10



I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. PCT/US 93/04018	
Assigning or Transferring Prior Classification (GPI) or its Sub-classes		Priority Date: 03-09-1992	
Int.Cl.5		B 01 L 3/00	C 12 M 3/08
		G 01 N 15/10	
II. FIELD OF SEARCHED			
"Unknown Correspondence Attached"			
Classification System		Classification System	
Int.Cl.5		B 01 L	C 12 M
Classification Standard other than International Classification to the Extent that such Classifications are included in the Filed Document(s)			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category		Classification of Document, if not otherwise, where appropriate, of the relevant passage	Reference to Class "List"
X	US.A,4676274 (J.F.BROWN) 30 June 1987		1-2
A	see column 9, line 22 - line 30; figure 12 see column 12, line 10 - line 60; figure 18 see column 12, line 45 - line 50 see column 12, line 44 - line 45		3-4,6,3 -4
X	1988 IEEE INDUSTRY APPLICATIONS SOCIETY ANNUAL MEETING vol. 2, October 1988, ATLANTA (US) pages 1735 - 1740 WASHIZU ET AL. 'handling of biological cells using fluid integrated circuit' cited in the application see page 1735, column 2, paragraph 2 see page 1739, column 1 ---		1,2
		-/-	
<p>* General description of what is claimed:</p> <p>"A" denotes features also present in the art which it is considered to be of particular interest.</p> <p>"B" denotes features not present in or after the International Filing Date.</p> <p>"C" denotes general or specific features as present in or before the International Filing Date.</p> <p>"D" denotes general or specific features as present in or before the priority date.</p> <p>"E" denotes reference to an earlier document, e.g. continuation or divisional application.</p> <p>"F" denotes reference to an event, measure, etc. relating to your application.</p> <p>"G" denotes features present prior to the International filing date but later than the priority date claimed.</p> <p>"H" denotes features published after the International filing date or features which are present in the application but not in or before the International filing date making the invention nonobvious.</p> <p>"I" denotes features which are claimed in combination in a manner which makes the invention nonobvious.</p> <p>"J" denotes features which are claimed separately in a manner which makes the invention nonobvious.</p> <p>"K" denotes features which are claimed separately in a manner which makes the invention nonobvious.</p> <p>"L" denotes features which are claimed separately in a manner which makes the invention nonobvious.</p>			
<p>P. CERTIFICATION</p> <p>Date at the above Designation of the International Search: 03-09-1992</p> <p>International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE</p> <p>Date of Meeting of the International Search Report: 28.01.94</p> <p>Signature of International Office: HOC QUEST A.P.</p>			

特表平7-506257 (9)

International Application No. PCT/US 93/04018		Category 1 Character of Document, with reference, where appropriate, of the relevant document	Reference to Class No.
ID DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		
A	1987 IEEE INDUSTRY APPLICATIONS SOCIETY ANNUAL MEETING vol. 2, October 1987, ATLANTA (US) pages 1549 - 1552 MASUDA ET AL. 'novel method of cell fusion in field constriction area in fluid integrated circuit' cited in the application see figures 2-3	1	
A	DE-A- 4028771 (SOBOLEWSKI) 21 February 1991	3,7	
A	US-A-4350768 (TIHOW ET AL.) 21 September 1982 see column 4, line 20 - line 51	8,9	

Form PCT/ISA/310 (continuation of first sheet (1)) (July 1993)

International Application No. PCT/US 93/04018	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
<p>The International search report has not been modified to respect of certain claims under Article 17(3)(c) for the following reasons:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Claims from which they relate to subject matter not required to be searched by that Authority, namely: 	
<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Claims from which they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 	
<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Claims from which they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third conditions of Rule 4(a). 	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
<p>The International Searching Authority found multiple inventions in the international application, or failure:</p> <p>For further information please see form PCT/ISA/206 mailed 27.09.93.</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> All of requested additional search fees were timely paid by the applicant, the international search report covers all inventions. <input type="checkbox"/> As all inventions claimed by the applicant without effort specifying an inventor for, the Authority did not charge payment of any additional fee. <input type="checkbox"/> At only some of the requested additional search fees were timely paid by the applicant, the international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claimed fees. 	
<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> No requested additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, the International search report is limited to the inventions first mentioned in the claims it is covered by claim 1(a). <p>Claims 1-2,3-9</p>	
<p>Search as Filing</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were compensated by the applicant's agent.</p> <p><input type="checkbox"/> Are present compensated the expenses of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/310 (continuation of first sheet (1)) (July 1993)

国际調査報告

US 9304018
SA 73833

This document lists the patent family numbers referring to the general denominations cited in the above-mentioned International search report. These numbers are as recorded in the European Patent Office EPO file no 1411293. The European Patent Office is in no way liable for other patent numbers which are merely given for the purpose of information.

Patent document used in search report	Publication date	Patent family number	Publication date
US-A- 4676274	30-06-87	EP-A- 0293519	07-12-88
DE-A- 4028771	21-02-91	DE-U- 8911026	02-11-89
US-A- 4350768	21-09-82	US-A- 4413059	01-11-83

For more details about this notice, see Official Journal of the European Patent Office, Ann. 12/93

特表平7-506257 (10)

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 877, 662
(32) 優先日 1992年5月1日
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 877, 701
(32) 優先日 1992年5月1日
(33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 877, 702
(32) 優先日 1992年5月1日
(33) 優先権主張国 米国(US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP
(72) 発明者 ゼメル, ジェイ・エヌ
アメリカ合衆国19046ペンシルベニア州、
ジェンキンタウン、ミーティングハウス・
ロード223番